

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

03.03.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2002年 3月 4日

REC'D 25 APR 2003

WIPO

PCT

出 願 番 号

Application Number:

特願2002-057926

[ST.10/C]:

[JP2002-057926]

出 願 人

Applicant(s):

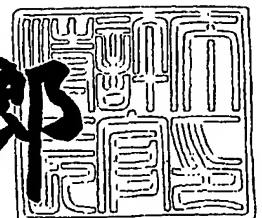
学校法人慶應義塾

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 4月 8日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



Best Available Copy

出証番号 出証特2003-3024259

【書類名】 特許願
 【整理番号】 000000282
 【提出日】 平成14年 3月 4日
 【あて先】 特許庁長官殿
 【国際特許分類】 G01N 33/53
 C12N 15/12

【発明者】

【住所又は居所】 東京都新宿区信濃町 3 5 番地 慶應義塾大学医学部内

【氏名】 戸田 正博

【発明者】

【住所又は居所】 東京都新宿区信濃町 3 5 番地 慶應義塾大学医学部内

【氏名】 上田 政和

【発明者】

【住所又は居所】 東京都新宿区信濃町 3 5 番地 慶應義塾大学医学部内

【氏名】 河上 裕

【発明者】

【住所又は居所】 東京都新宿区信濃町 3 5 番地 慶應義塾大学医学部内

【氏名】 大橋 陽平

【特許出願人】

【識別番号】 899000079

【氏名又は名称】 学校法人 慶應義塾

【代理人】

【識別番号】 100107984

【弁理士】

【氏名又は名称】 廣田 雅紀

【選任した代理人】

【識別番号】 100102255

【弁理士】

【氏名又は名称】 小澤 誠次

【選任した代理人】

【識別番号】 100118957

【弁理士】

【氏名又は名称】 岡 晴子

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 044347

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 悪性脳腫瘍の診断・治療薬

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ヒトグリオーマ又はヒトグリオーマ細胞株由来のジェノミック DNA と、正常組織由来のジェノミック DNA とにおける CpG アイランドのシトシン残基のメチル化の程度を比較することを特徴とする癌抑制遺伝子又は癌遺伝子のスクリーニング方法。

【請求項 2】 癌抑制遺伝子又は癌遺伝子が、ヒトグリオーマの癌抑制遺伝子又は癌遺伝子であることを特徴とする請求項 1 記載の癌抑制遺伝子又は癌遺伝子のスクリーニング方法。

【請求項 3】 ヒトグリオーマの癌抑制遺伝子が、RFX1 遺伝子又は BGT-1 遺伝子であることを特徴とする請求項 2 記載の癌抑制遺伝子又は癌遺伝子のスクリーニング方法。

【請求項 4】 ヒトグリオーマの癌遺伝子が、HOXD9、HOXD8、HOXA9、HOXB9 又は HOXC9 等の HOX 遺伝子であることを特徴とする請求項 2 記載の癌抑制遺伝子又は癌遺伝子のスクリーニング方法。

【請求項 5】 請求項 1～4 のいずれか記載のスクリーニング方法により得られるヒトグリオーマ等の癌抑制遺伝子又は癌遺伝子の、メチル化の程度、遺伝子変異の有無、遺伝子発現の程度、タンパク質発現の程度の少なくともいずれか 1 つを測定することを特徴とするヒトグリオーマ等の癌の診断方法。

【請求項 6】 請求項 1～4 のいずれか記載のスクリーニング方法により得られるヒトグリオーマ等の癌抑制遺伝子又は癌遺伝子の、メチル化の程度、遺伝子変異の有無、遺伝子発現の程度、タンパク質発現の程度の少なくともいずれか 1 つを測定することができる試薬を備えたことを特徴とするヒトグリオーマ等の癌の診断薬。

【請求項 7】 請求項 1～3 のいずれか記載のスクリーニング方法により得られるヒトグリオーマ等の癌抑制遺伝子を癌細胞で発現させるか、あるいは、前記癌抑制遺伝子の発現産物、メチル基転移酵素阻害剤、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の少なくともいずれか 1 つを癌患者に投与することを特徴とするヒトグ

リオーマ等の癌の治療方法。

【請求項 8】 請求項 1～3 のいずれか記載のスクリーニング方法により得られるヒトグリオーマ等の癌抑制遺伝子、前記癌抑制遺伝子の発現産物、メチル基転移酵素阻害剤、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の少なくともいずれか 1 つを含有することを特徴とするヒトグリオーマ等の癌の治療薬。

【請求項 9】 請求項 1、2 又は 4 記載のスクリーニング方法により得られるヒトグリオーマ等の癌遺伝子の発現抑制剤又は該癌遺伝子の発現産物に特異的に結合するペプチド・タンパク質等の化合物を癌患者に投与することを特徴とするヒトグリオーマ等の癌の治療方法。

【請求項 10】 請求項 1、2 又は 4 記載のスクリーニング方法により得られるヒトグリオーマ等の癌遺伝子の発現抑制剤又は該癌遺伝子の発現産物に特異的に結合するペプチド・タンパク質等の化合物を含有することを特徴とするヒトグリオーマ等の癌の治療薬。

【請求項 11】 請求項 1～4 のいずれか記載のスクリーニング方法により得られるヒトグリオーマ等の癌抑制遺伝子又は癌遺伝子を標的としたことを特徴とするヒトグリオーマ等の癌の診断又は治療方法。

【請求項 12】 請求項 1～4 のいずれか記載のスクリーニング方法により得られるヒトグリオーマ等の癌抑制遺伝子又は癌遺伝子を標的としたことを特徴とするヒトグリオーマ等の癌の診断又は治療薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ヒトの悪性脳腫瘍であるグリオーマ等の癌抑制遺伝子又は癌遺伝子のスクリーニング方法、ヒトグリオーマ等の癌の診断方法・診断薬、ヒトグリオーマ等の癌の治療方法・治療薬に関する。

【0002】

【従来の技術】

癌の発生と進展には癌遺伝子や癌抑制遺伝子の異常が深く関係している。とくに p 53 などの癌抑制遺伝子が遺伝子の発現を調節するマスター遺伝子であるこ

とが明らかとなり、癌抑制遺伝子の異常は癌化において極めて重要な役割を果たしていると考えられている。最近、癌の発症にDNAメチル化が関わることが報告されている(Adv.Cancer Res., 72, 141-196, 1998)。また、癌抑制遺伝子の不活性化の機構として、ジェノミックDNAの異常メチル化が注目されている。遺伝子の近傍5'部位のCpG配列に富む領域はCpGアイランドと呼ばれ、通常ヒトゲノム中のCpG配列の多くはメチル化されているが、正常組織におけるCpGアイランド中のCpG配列は、遺伝子の発現の有無にかかわらずメチル化を受けていない。しかし、癌においてはCpGアイランドがメチル化され、様々な遺伝子の発現が抑制・消失している。メチル化されたCpGアイランドにはMeCP2 (methyl CpG binding repressor 2) と呼ばれるメチル化CpG結合タンパク質が結合し、ヒストン脱アセチル化酵素やクロマチン再構築因子の複合体をメチル化領域にリクルートする。その結果、周辺のクロマチン構造が縮合型に変化し、RNAポリメラーゼや転写因子がプロモーター領域に入っていけなくなるため、転写発現が低下する(J.Biochem., 125, 217-222, 1999)。

近年、メチル化されているCpGアイランドを同定する手法として、メチル化感受性制限酵素Not Iを利用したRLGS (restriction landmark genome scanning) 法が開発されている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、ヒトグリオーマ等の癌の診断や治療に有用な癌抑制遺伝子あるいは癌遺伝子を同定し、ヒトグリオーマ等の癌の診断方法や診断薬、ヒトグリオーマ等の癌の治療方法や治療薬を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、メチル化感受性制限酵素を用いたRLGS法により、グリオーマにおけるメチル化の異常を解析し、グリオーマにおけるRFX1およびBGT-1遺伝子の発現が減少あるいは消失することや、HOXD9遺伝子が異所性にグリオーマにおいて発現していることなどを見い出した。この結果、上記RLGS法で同定された遺伝子のグリオーマを含む癌の診断、治療薬としての有用性が

明らかになり、本発明を完成するに至った。

【0005】

すなわち本発明は、ヒトグリオーマ又はヒトグリオーマ細胞株由来のジェノミックDNAと、正常組織由来のジェノミックDNAとにおけるCpGアイランドのシトシン残基のメチル化の程度を比較することを特徴とする癌抑制遺伝子又は癌遺伝子のスクリーニング方法（請求項1）や、癌抑制遺伝子又は癌遺伝子が、ヒトグリオーマの癌抑制遺伝子又は癌遺伝子であることを特徴とする請求項1記載の癌抑制遺伝子又は癌遺伝子のスクリーニング方法（請求項2）や、ヒトグリオーマの癌抑制遺伝子が、RFX1遺伝子又はBGT-1遺伝子であることを特徴とする請求項2記載の癌抑制遺伝子又は癌遺伝子のスクリーニング方法（請求項3）や、ヒトグリオーマの癌遺伝子が、HOXD9、HOXD8、HOXA9、HOXB9又はHOXC9等のHOX遺伝子であることを特徴とする請求項2記載の癌抑制遺伝子又は癌遺伝子のスクリーニング方法（請求項4）に関する。

【0006】

また本発明は、請求項1～4のいずれか記載のスクリーニング方法により得られるヒトグリオーマ等の癌抑制遺伝子又は癌遺伝子の、メチル化の程度、遺伝子変異の有無、遺伝子発現の程度、タンパク質発現の程度の少なくともいずれか1つを測定することを特徴とするヒトグリオーマ等の癌の診断方法（請求項5）や、請求項1～4のいずれか記載のスクリーニング方法により得られるヒトグリオーマ等の癌抑制遺伝子又は癌遺伝子の、メチル化の程度、遺伝子変異の有無、遺伝子発現の程度、タンパク質発現の程度の少なくともいずれか1つを測定することができる試薬を備えたことを特徴とするヒトグリオーマ等の癌の診断薬（請求項6）や、請求項1～3のいずれか記載のスクリーニング方法により得られるヒトグリオーマ等の癌抑制遺伝子を癌細胞で発現させるか、あるいは、前記癌抑制遺伝子の発現産物、メチル基転移酵素阻害剤、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の少なくともいずれか1つを癌患者に投与することを特徴とするヒトグリオーマ等の癌の治療方法（請求項7）や、請求項1～3のいずれか記載のスクリーニング方法により得られるヒトグリオーマ等の癌抑制遺伝子、前記癌抑制遺伝子の発現産物、メチル基転移酵素阻害剤、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の少なくとも

もいずれか1つを含有することを特徴とするヒトグリオーマ等の癌の治療薬（請求項8）や、請求項1、2又は4記載のスクリーニング方法により得られるヒトグリオーマ等の癌遺伝子の発現抑制剤又は該癌遺伝子の発現産物に特異的に結合するペプチド・タンパク質等の化合物を癌患者に投与することを特徴とするヒトグリオーマ等の癌の治療方法（請求項9）や、請求項1、2又は4記載のスクリーニング方法により得られるヒトグリオーマ等の癌遺伝子の発現抑制剤又は該癌遺伝子の発現産物に特異的に結合するペプチド・タンパク質等の化合物を含有することを特徴とするヒトグリオーマ等の癌の治療薬（請求項10）に関する。

【0007】

さらに本発明は、請求項1～4のいずれか記載のスクリーニング方法により得られるヒトグリオーマ等の癌抑制遺伝子又は癌遺伝子を標的としたことを特徴とするヒトグリオーマ等の癌の診断又は治療方法（請求項11）や、請求項1～4のいずれか記載のスクリーニング方法により得られるヒトグリオーマ等の癌抑制遺伝子又は癌遺伝子を標的としたことを特徴とするヒトグリオーマ等の癌の診断又は治療薬（請求項12）に関する。

【0008】

【発明の実施の形態】

本発明の癌抑制遺伝子又は癌遺伝子のスクリーニング方法としては、ヒトグリオーマ又はヒトグリオーマ細胞株由来のジェノミックDNAと、正常組織由来のジェノミックDNAとにおけるCpGアイランドのシトシン残基のメチル化の程度を比較する方法であれば特に制限されるものではなく、上記スクリーニングの対象となる癌抑制遺伝子としては、RFX1遺伝子、BGT-1遺伝子等のヒトグリオーマなどの癌抑制遺伝子を挙げることができ、癌遺伝子としては、HOX（HOXD9、HOXD8、HOXA9、HOXB9、HOXC9など）遺伝子等のヒトグリオーマなどの癌遺伝子を挙げることができる。

【0009】

CpGアイランドのシトシン残基のメチル化の状態を調べる方法としては、メチル化感受性制限酵素を用いる方法（Nucleic Acids Res., 26, 2255-2264, 1998）、ヒドラジンや過マンガン酸や重亜硫酸ナトリウムによる化学修飾を用いる

方法、メチル化DNAに特異的な抗体を用いた免疫学的方法 (Nucleic Acids Res., 26, 2255-2264, 1998)、MeCP2などのMBD (methyl-CpG binding domain) を用いたアフィニティ・カラム法およびDGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) 法 (Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 96, 2913-2918, 1999) など、公知の方法を含め、CpGアイランドのシトシン残基のメチル化の程度を調べる方法であれば特に制限されないが、メチル化感受性酵素Not Iを用いたRLGS解析を好適に挙げることができる。

【0010】

本発明のヒトグリオーマ等の癌の診断方法としては、上記のスクリーニング方法により得られるヒトグリオーマ等の癌抑制遺伝子又は癌遺伝子を標的とした癌の診断方法であれば特に制限されるものではなく、例えば、上記癌抑制遺伝子又は癌遺伝子の、メチル化の程度、遺伝子発現の有無、遺伝子発現の程度、タンパク質発現の程度の少なくともいずれか1つを測定する方法を挙げることができる。上記メチル化の程度を測定する方法としては、前記CpGアイランドのシトシン残基のメチル化の状態を調べる方法を例示することができ、遺伝子発現の有無を調べる方法としては、PCR-SSCP法やDNAシーケンスを比較する方法を例示することができ、遺伝子発現の程度を測定する方法としては、前記癌抑制遺伝子又は癌遺伝子に特異的なプライマーを用いるRT-PCR法等を例示することができ、タンパク質発現の程度を測定する方法としては、前記癌抑制遺伝子又は癌遺伝子の発現産物に対するモノクローナル抗体を用いるウエスタンブロット法等を例示することができる。かかる診断方法に用いられる検体としては、被験者の細胞、例えば血液、尿、唾液、組織等の生検から得ることができるジェノミックDNAや、RNA、cDNA又はタンパク質を具体的に挙げることができるがこれらに限定されるものではない。

【0011】

本発明のヒトグリオーマ等の癌の診断薬としては、上記のスクリーニング方法により得られるヒトグリオーマ等の癌抑制遺伝子又は癌遺伝子を標的とした癌の診断薬であれば特に制限されるものではなく、例えば、上記癌抑制遺伝子又は癌遺伝子の、メチル化の程度、遺伝子発現の有無、遺伝子発現の程度、タンパク質

発現の程度の少なくともいずれか1つを測定することができる試薬を備えたものを挙げる事ができる。上記メチル化の程度を測定することができる試薬としては、例えばメチル化感受性酵素とRLGS解析用試薬を例示することができ、遺伝子発現の有無を測定することができる試薬としては、PCR-SSCP解析用試薬を例示することができ、遺伝子発現の程度を測定することができる試薬としては、前記癌抑制遺伝子又は癌遺伝子に特異的なプライマーとRT-PCR用試薬等を例示することができ、タンパク質発現の程度を測定することができる試薬としては、前記癌抑制遺伝子又は癌遺伝子の発現産物に対するモノクローナル抗体と標識化2次抗体等のウエスタンブロット用試薬などを例示することができる。

【0012】

本発明のヒトグリオーマ等の癌の治療方法としては、上記のスクリーニング方法により得られるRFX1遺伝子、BGT-1遺伝子等の癌抑制遺伝子を標的としたヒトグリオーマ等の癌の治療方法であれば特に制限されるものではなく、また、本発明のヒトグリオーマ等の癌の治療薬としては、上記のスクリーニング方法により得られるRFX1遺伝子、BGT-1遺伝子等の癌抑制遺伝子を標的としたヒトグリオーマ等の癌の治療方法であれば特に制限されるものではない。上記RFX1遺伝子、BGT-1遺伝子等の癌抑制遺伝子を標的としたヒトグリオーマ等の癌の治療方法としては、例えば、RFX1遺伝子、BGT-1遺伝子等の癌抑制遺伝子を癌細胞で発現させるか、あるいは、前記癌抑制遺伝子の発現産物、メチル基転移酵素阻害剤、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の少なくともいずれか1つを癌患者に投与する方法を挙げる事ができる。また、上記RFX1遺伝子、BGT-1遺伝子等の癌抑制遺伝子を標的としたヒトグリオーマ等の癌の治療薬としては、例えば、RFX1遺伝子、BGT-1遺伝子等の癌抑制遺伝子、好ましくは癌抑制遺伝子を含む発現ベクター、あるいは、前記癌抑制遺伝子の発現産物、メチル基転移酵素阻害剤、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の少なくともいずれか1つを含有するものであれば特に制限されるものではない。

【0013】

遺伝子治療として、上記RFX1遺伝子、BGT-1遺伝子等の癌抑制遺伝子

を含む発現ベクターを局所投与する場合、前記癌抑制遺伝子の発現産物を有効成分とする治療薬を局所投与する場合に比べて、癌抑制遺伝子の安定した発現により、癌抑制遺伝子の発現産物を局所に安定的に供給することが可能になる。例えば、発現ベクターを用いて、ヒトグリオーマ細胞へ癌抑制遺伝子を導入することにより、所定の期間の安定した発現を得ることができる。このようなベクターとしては、ヘルペスウイルス（HSV）ベクター、アデノウイルスベクター、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）ベクター等のウイルスベクターを好適に挙げることができるが、これらウイルスベクターの中でもHSVベクターが好ましい。HSVベクターは、HSVが細胞のジェノミックDNAに組み込まれないため安全であり、また、導入遺伝子の発現期間を調節することが可能である。また、これら癌抑制遺伝子を含む発現ベクターは、常法により調製することができる。

【0014】

ヒトグリオーマの治療薬としてのメチル基転移酵素阻害剤としては、5-アザシチジン、5-アザ-2'-デオキシシトジン、S-アデノシルホモシステイン等の化合物を挙げることができ、また、ヒトグリオーマの治療薬としてのヒストン脱アセチル化酵素阻害剤としては、酪酸、微生物代謝産物のトリコスタチンA（J.Biol.Chem. 265, 17174-17179, 1990）やトラボキシシン（J.Biol.Chem. 268, 22429-22435, 1993）、Depudecin（Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95, 3356-3361, 1998）、フェニル酪酸（J.Natl.Cancer Inst. 90(21), 1621-1625, 1998）、FR-901228（Exp.Cell Res. 241, 126-133, 1998）、MS-27-275（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 4592-4597, 1999）、ベンズアミド誘導体（特開平11-335375）、ジチオール誘導体（特開2001-354694）などの化合物を挙げることができる。

【0015】

本発明の他の態様のヒトグリオーマ等の癌の治療方法としては、上記のスクリーニング方法により得られるのH O X遺伝子等の癌遺伝子を標的としたヒトグリオーマ等の癌の治療方法であれば特に制限されるものではなく、また、本発明の他の態様のヒトグリオーマ等の癌の治療薬としては、上記のスクリーニング方法により得られるH O X遺伝子等の癌遺伝子を標的としたヒトグリオーマ等の癌の治療薬であれば特に制限されるものではない。上記H O X遺伝子等の癌遺伝子を

標的としたヒトグリオーマ等の癌の治療方法としては、上記癌遺伝子の発現抑制剤や上記癌遺伝子の発現産物に特異的に結合するペプチド・タンパク質等の化合物を癌患者に投与する方法を挙げることができ、また、本発明の他の態様のヒトグリオーマ等の癌の治療薬としては、上記癌遺伝子の発現抑制剤や上記癌遺伝子の発現産物に特異的に結合するペプチド・タンパク質等の化合物を含有するものであれば特に制限されるものではない。

【0016】

上記癌遺伝子の発現抑制剤としては、例えば癌遺伝子DNA又はそのmRNAのアンチセンス鎖の全部又は一部を挙げることができるが、20bp以上からなるDNA又はRNAが好ましい。かかるアンチセンス鎖の局所への投与は、前記のようにウイルスベクターを用いることができるが、ヒトグリオーマ等の癌細胞に対するモノクローナル抗体を用いることにより、選択的にグリオーマ等にアンチセンス鎖を導入させることもできる。また、上記癌遺伝子の発現産物に特異的に結合するペプチド・タンパク質等の化合物としては、癌遺伝子の発現産物に対するモノクローナル抗体等の抗体やその可変領域などを挙げることができる。

【0017】

上記本発明の癌の治療薬には、薬学的に許容される通常の担体、結合剤、安定化剤、賦形剤、希釈剤、pH緩衝剤、崩壊剤、可溶化剤、溶解補助剤、等張剤などの各種調剤用配合成分を適宜添加することができる。またかかる治療薬は、経口的又は非経口的に投与することができる。すなわち通常用いられる投与形態、例えば粉末、顆粒、カプセル剤、シロップ剤、懸濁液等の剤型で経口的に投与することができ、あるいは、例えば溶液、乳剤、懸濁液等の剤型にしたものを注射の型で非経口に局所に投与することができる他、スプレー剤の型で鼻孔内投与することもできる。本発明のこれら治療薬の投与量は、用法、患者の年齢、性別、疾患の程度およびその他の条件により適宜選択されるが、通常有効成分化合物の量としては、体重1kg当り、1日約0.0001～100mg程度とするのがよい。また投与単位形態の製剤中には有効成分化合物が約0.001～1,000mgの範囲で含有されることが望ましい。

【0018】

以上、本発明の癌の診断・治療方法、診断・治療薬における癌がヒト悪性脳腫瘍であるヒトグリオーマについて主として述べてきたが、本発明の対象となる癌はグリオーマに限定されるものでなく、ヒトのグリオーマの他、子宮頸癌、上皮様癌、T細胞腫、前骨髄性白血病、食道癌、脾癌、悪性黒色腫、肺癌、口腔癌、乳癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、神経芽細胞腫、大腸癌などを例示することができる。

【0019】

【実施例】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

実施例1 [材料と方法]

実施例1A (細胞株、腫瘍)

ヒトグリオーマ細胞株であるT98G、U87MG、A172はアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)から、U251、G1-1は理研ジーンバンクから購入したものを用いた。これらのグリオーマ細胞株は牛胎児血清を10%添加したDMEM培地を用いて培養した。ヒトグリオーマ組織(GB4、GB13、GB16、GB17、GB26、GB30)は同意を得られた患者の手術時に摘出された病変の一部を用いた。ヒトグリオーマ組織(GB26及びGB30)、同患者の血液、また同意を得た健常人の血液から高分子量のジェノミックDNAを調製した。

【0020】

実施例1B (メチル化感受性酵素Not Iを用いたRLGS解析)

基本的にRLGSは林崎らの方法(Electrophoresis, 16, 1995)に従って行った。腫瘍組織および血液から抽出されたジェノミックDNAをメチル化感受性酵素Not Iで切断した後、末端を ^{32}P にて標識した。さらに制限酵素Pvu IIで切断した後、アガロースゲルを用いて一次元目の電気泳動を行った。続いて、アガロースゲルを制限酵素Pst Iを含む溶液中で酵素処理を行った後、ポリアクリルアミドゲルを用いて二次元目の電気泳動を行った。泳動後、ポリアクリルアミドゲルを乾燥させて、オートラジオグラフィーを行ない、標識されたDNA断片を

可視化した。

【0021】

実施例1C (DNA断片の単離とジェノミック・シーケンシング)

ヒトグリオーマ由来DNAと同じ患者の血液由来DNAとのRLGSプロファイルと比較して、グリオーマ2例で共通して発現が減少あるいは消失していたスポットを、ヒト胎盤由来DNAのRLGSゲルから単離した。切り出したDNA断片をゲルから溶出後、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコールによりDNAを抽出した。抽出されたDNAをNot IおよびPst Iアダプターと結合させて、アダプターに特異的なプライマーを用いてPCRで増幅した。シーケンシング反応はBig Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit(PE Applied Biosystems社製)を用いて行ない、ABI PRISM 3100 Genetic Analyzerにより解析した。DNAが微量で直接シーケンスができなかった場合、PCR産物をpGEM-T Easy vector(プロメガ社製)にサブクローニングした後、シーケンシングを行なった。得られた配列をNational Center for Biotechnology Information(NCBI)のデータベースを利用して、塩基配列の相同性を解析した。

【0022】

実施例1D (RNA調製とRT-PCR)

ヒトグリオーマ組織(GB4、GB13、GB16、GB17)とヒトグリオーマ細胞株由来の全RNAはTrizol(ギブコ社製)を用いて抽出し、正常組織の全RNAはクローンテック社より購入した。cDNAの合成は10 μ gの全RNAより、逆転写酵素XL(AMV)(宝酒造社製)を用いて行ない、最終量は100 μ lとした。1 μ lのcDNA鋳型を用いてTakara TaqTM(宝酒造社製)を用いて総量25 μ lの系でPCRを行なった。反応液には2.5 μ lの10 \times PCR-Buffer[100mM Tris-HCl(pH8.3)、500mM KCl、15mM MgCl₂]と2 μ lのdeoxyribonucleotide triphosphate mixture(2.5mM each)、と0.1 μ Mのプライマーを添加した。プライマーの塩基配列としては、RFX1遺伝子についてはセンスプライマー[5'-GAA GAT GGA AGG CAT GAC C-3'(配列番号1)]とアンチセンスプライマー[5'-GGC TCT TGG CAA AGT TCC-3'(配列番号2)]を用い、HOXA9遺伝

子についてはセンスプライマー [5'-CGAAGGCGCCTTCTCCGAAA-3' (配列番号 3)] とアンチセンスプライマー [5'-AAATGGCATCACTCGTCTTTTGCTC-3' (配列番号 4)] を用い、H O X B 9 遺伝子についてはセンスプライマー [5'-CACGCCCGAGTACAGTTTGG-3' (配列番号 5)] とアンチセンスプライマー [5'-GACTTGTCTCTCACTCAGATTGAGG-3' (配列番号 6)] を用い、H O X C 9 遺伝子についてはセンスプライマー [5'-GGCAGCAAGCACAAAGAGGA-3' (配列番号 7)] とアンチセンスプライマー [5'-AGGCTGGGTAGGGTTTAGGAC-3' (配列番号 8)] を用い、H O X D 9 遺伝子についてはセンスプライマー [5'-CTTGACCCAAACAACCCC-3' (配列番号 9)] とアンチセンスプライマー [5'-CTCTCTGTTAGGTTGAGAATCC-3' (配列番号 10)] を用い、H O X D 8 遺伝子についてはセンスプライマー [5'-GCCAGGAGTACTTCCACC-3' (配列番号 11)] とアンチセンスプライマー [5'-GTTTCCCCGTCCTTCACC-3' (配列番号 12)] を用い、B G T - 1 遺伝子についてはセンスプライマー [5'-GAGCATTGACGGACTTTCTGAACC-3' (配列番号 13)] とアンチセンスプライマー [5'-CCAGGATGGAGAAGACAACAAACCC-3' (配列番号 14)] を用い、G A P D H についてはセンスプライマー [5'-TGA ACG GGA AGC TCA CTG G-3' (配列番号 15)] とアンチセンスプライマー [5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3' (配列番号 16)] を用い、 β -a c t i n についてはセンスプライマー [5'-GTC GAC AAC GGC TCC GGC ATG TGC-3' (配列番号 17)] とアンチセンスプライマー [5'-GGA TCT TC A TGA GGT AGT CAG TCA G-3' (配列番号 18)] を用いた。

【 0 0 2 3 】

また、P C R は以下の反応条件で行った。

- ① R F X 1 については、94℃で5分間変性させた後、94℃で1分間変性させ、57℃で1分間アニーリングし、72℃で1分間伸長反応させるというサイクルを30回繰返し、最後に72℃で7分間伸長反応を行った。
- ② H O X A 9、B 9 及び C 9 については、94℃で5分間変性させた後、94℃で1分間変性させ、62℃で1分間アニーリングし、72℃で1分間伸長反応させるというサイクルを35回繰返し、最後に72℃で7分間伸長反応を行った。
- ③ H O X D 9 については、94℃で5分間変性させた後、94℃で1分間変性させ、57℃で1分間アニーリングし、72℃で1分間伸長反応させるというサイ

クルを35回繰返し、最後に72℃で7分間伸長反応を行った。

④HOXD8については、94℃で5分間変性させた後、94℃で1分間変性させ、58℃で1分間アニーリングし、72℃で2分間伸長反応させるというサイクルを35回繰返し、最後に72℃で7分間伸長反応を行った。

⑤BGT1については、94℃で5分間変性させた後、94℃で1分間変性させ、65℃で1分間アニーリングし、72℃で2分間伸長反応させるというサイクルを35回繰返し、最後に72℃で7分間伸長反応を行った。

⑥GAPDHについては、94℃で5分間変性させた後、94℃で1分間変性させ、58℃で1分間アニーリングし、72℃で1分間伸長反応させるというサイクルを25回繰返し、最後に72℃で7分間伸長反応を行った。

⑦β-actinについては、94℃で5分間変性させた後、94℃で1分間変性させ、68℃で1分間アニーリングし、72℃で2分間伸長反応させるというサイクルを20回繰返し、最後に72℃で7分間伸長反応を行った。

得られた各PCR産物を2%のアガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色して解析した。

【0024】

実施例1E（5-アザシチジン及びトリコスタチンA処理）

ヒトグリオーマ細胞株を低密度で培養し、24時間後に5-アザシチジン（メチル基転移酵素阻害剤）（シグマ社製）を500nMになるように加えた。5-アザシチジン入りの培養液は24時間ごとに取り替え、3日間培養し、最後の24時間にトリコスタチンA（ヒストン脱アセチル化阻害剤）（和光社製）を50ng/mlになるように添加した。その後Trizolを用いて全RNAを抽出し、cDNA合成後、PCRを行ない、各薬剤による遺伝子発現の変化を解析した。

【0025】

実施例1F（パイサルファイト・ジェノミック・シーケンシング）

1μgのジェノミックDNAから、CpGenome DNA Modification Kit(Intergen社製)を用いて、パイサルファイト変換を行った。この過程で非メチル化シトシンはウラシルに変化し、メチル化シトシンは変化しない。処理したDNAは50μlの蒸留水に溶解させ、これを鋳型として、RFX1の第7イントロンに特異

的なプライマーを用いてまず1回目のPCRを行った。ここで用いたプライマー配列は以下の通りである。RFX1-第7イントロンセンスプライマー1:5'-GGT TTT GGG TTA GTT TTA ATT TTT-3' (配列番号19)、RFX1-第7イントロンアンチセンスプライマー1:5'-TTC TCT AAA TCC TAA CCC TCT AA-3' (配列番号20)。PCR反応条件は次の通りである: 98℃で5分間変性させた後、98℃で1分間変性させ、50℃で2分間アニーリングし、72℃で2分間伸長反応させるというサイクルを45回繰返し、最後に72℃で7分間伸長反応を行った。さらに1回目のPCR産物を用いて、Nested PCRを行った。鋳型としては1回目のPCR産物を25倍希釈したものを1μl用いた。プライマー配列は次の通りである。RFX1-第7イントロンセンスプライマー2:5'-GGT GGA GGT TTG GAG TTT-3' (配列番号21)、RFX1-第7イントロンアンチセンスプライマー2:5'-ACA AAA ACA AAT ATA AAA ACA ACA-3' (配列番号22)。また、PCRの条件は次の通りである: 98℃で5分間変性させた後、98℃で1分間変性させ、50℃で1分間アニーリングし、72℃で1分間伸長反応させるというサイクルを45回繰返し、最後に72℃で7分間伸長反応を行った。このPCR産物はpGEM-T Easy Vector (プロメガ社製) にサブクローニングした後シーケンシングを行なった。

【0026】

実施例2 [結果]

実施例2A (RLGSプロファイル)

図1Aに示すように、RLGSプロファイル上には約2500のスポットが観察されるが、今回は最も分解能が高い中心部の約400スポットを2例のグリオーマ(GB26およびGB30)と正常(それぞれ対応した患者血液)で比較解析した。この解析ではメチル化DNAを切断しないNot IをランドマークにRLGSを行なったため、正常と比較して異常にメチル化されたDNA領域に対応するスポットは消失あるいは信号が減弱する。本解析の結果、グリオーマ2例において共通して欠失および信号強度の減少した12個のスポットを同定した(図1Bおよび表1)。

【0027】

【表 1】

Clone No.	Chromosome	GC%	CpG ratio [#]	Related gene	Location	Function of gene
1	19	65	0.53	RFX1	intron	transcription regulator
2	15	54.4	0.77	none		
3	12	60.9	0.59	BGT-1	3'	neurotransmitter transporter
4				not identified		
5	5	63.8	0.67	ADAMTS2	intron	protease
6	2	64.6	0.94	HOXD9	5'	transcription factor
7	9	63.8	0.59	none		
8	15	67.8	0.59	FKSG88	exon&intron	unknown
9	14	58.3	0.78	CGI-112 Protein	5'	unknown
10	X	67.3	0.61	none		
11	12	67.1	0.58	ALK-1	3'	intracellular signal transducer
12	2	64.4	0.91	none		

【0028】

実施例 2 B (グリオーマにおいてメチル化された DNA 断片の単離と同定)

グリオーマの RLGS プロファイルにおいて欠失していた 12 個のスポットを胎盤の RLGS トラッパーゲルから単離し、シーケンシングを行った結果、解析可能であった全てのクローン (11 個) は、%GC と CpG ratio (CpGs の数) / (グアニンの数) (シトシンの数) × (解析塩基数) の結果から CpG アイランドに相当することが明らかになった (表 1)。さらにこれら単離された CpG アイランド近傍の遺伝子を検索するため BLAST search を行ったところ、7 つの遺伝子が同定された。例えばクローン 1 の DNA 断片は、19 番染色体の RFX1 遺伝子の第 7 イントロン内に存在することが明らかになった (図 2)。

【0029】

実施例 2 C (RT-PCR による遺伝子発現解析)

同定された 7 つの遺伝子の正常組織、グリオーマ組織、およびグリオーマ細胞株における発現を RT-PCR により解析した結果、以下の 3 つの遺伝子は興味深い発現パターンを呈していた。RFX1 遺伝子は正常組織では脳と精巣で発現が認められたが、グリオーマ組織 (2/4)、グリオーマ細胞株 (5/5) において発現の欠失あるいは減少が観察された (図 3)。同様に BGT-1 遺伝子は正常組織では脳、肝臓、腎臓、精巣で発現が認められたが、グリオーマ組織 (3

／4)、グリオーマ細胞株(5／5)において発現の欠失あるいは減少が観察された(図4)。一方、H O X D 9 遺伝子は正常では主に脾臓、腎臓、精巣で発現し、脳での発現が認められなかったが、グリオーマ組織(3／4)、グリオーマ細胞株(3／5)において発現が認められた(図5)。

【0030】

実施例2D(5-アザシチジン、トリコスタチンA処理による遺伝子再発現)

グリオーマにおけるR F X 1 およびB G T - 1 遺伝子の発現の減少あるいは消失とDNAのメチル化やヒストン脱アセチル化との関連性を調べるため、ヒトグリオーマ細胞株をメチル基転移酵素阻害剤である5-アザシチジンとヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるトリコスタチンAでそれぞれ処理した後、あるいは両方で細胞を処理した後、それぞれの遺伝子の発現変化をR T - P C R 法により解析した。その結果、コントロールと比較して、ヒトグリオーマU 2 5 1 細胞ではそれぞれの薬剤処理によりR F X 1 遺伝子の発現上昇が認められ、両者の薬剤処理によりさらに発現の増強が認められた(図6)。同様にB G T - 1 遺伝子に関しても、4種類のグリオーマ細胞株において、様々な程度であるが、薬剤処理によりコントロールと比較して発現の上昇が観察された(図7)。以上の結果から、グリオーマにおけるR F X 1 およびB G T - 1 の発現の減少がDNAのメチル化に関係することが示された。

【0031】

実施例2E(R F X 1 遺伝子第7イントロンのメチル化の解析)

さらにR F X 1 の第7イントロンのC p Gのメチル化の状態を詳しく調べるため、バイサルファイトシーケンスを行った。その結果、ヒトグリオーマU 2 5 1 のR F X 1 遺伝子第7イントロンでは、調べた30個のC p Gの内、27から30個がメチル化されていた。一方、正常人血液(一例)のR F X 1 遺伝子第7イントロンのC p Gではメチル化は見られなかった。R F X 1 は転写因子として、癌遺伝子の一つであるc - m y c 遺伝子の発現を抑制することが知られていることから、R F X 1 遺伝子は癌抑制遺伝子としてグリオーマの発生に関与していることが示唆された。したがって、これらの遺伝子は、メチル化状態、遺伝子発現、タンパク質発現を解析することでグリオーマの診断薬として有用である。ま

たグリオーマで発現が消失あるいは減少しているこれらの遺伝子をグリオーマで発現させることにより、治療薬としても有用であると考えられる。

【0032】

実施例 2 F (H O X 遺伝子の発現解析)

H O X 遺伝子群は動物の発生時に機能し、個体の前後軸における分化特異性を決定する遺伝子である。これらの遺伝子群はホメオボックスと呼ばれる DNA 結合配列を有し、その発現は高度に調節されている。図 5 に示されるように、H O X D 9 遺伝子が異所性にグリオーマにおいて発現していることが明らかになった。さらに、本来、正常脳組織に発現していない他の H O X 遺伝子 (H O X D 8、H O X A 9、H O X B 9、H O X C 9) に関しても、グリオーマにおいて異所性に発現しているかどうかを R T - P C R 法により解析した結果、調べた上記の H O X 遺伝子 (H O X D 8、H O X A 9、H O X B 9、H O X C 9) のいずれもが、正常人の脳では発現が認められなかったのに対して、グリオーマ細胞株において遺伝子の発現が観察された (図 8、図 9)。したがって、これら H O X 遺伝子は、メチル化されることにより、結果的に癌遺伝子としてグリオーマ (癌) の発生に関与していることが示唆された。以上の結果から、異所性に発現する H O X 遺伝子群は、グリオーマを含む癌の診断薬や治療薬として有用であると考えられる。

【0033】

【発明の効果】

本発明によると、ヒトグリオーマ等の癌の診断や治療に有用な R F X 1 遺伝子、B G T - 1 遺伝子等の癌抑制遺伝子あるいは H O X 遺伝子等の癌遺伝子を同定することができ、それら癌抑制遺伝子や癌遺伝子を標的としたヒトグリオーマ等の癌の診断方法や診断薬、ヒトグリオーマ等の癌の治療方法や治療薬を提供することができる。

【0034】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KEIO UNIVERSITY

<120> Diagnostic and therapeutic pharmaceutical for malignant
brain cancer

<130> 000000282

<140>

<141>

<160> 22

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:sense primer

<400> 1

gaagatggaa ggcattgacc

19

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:antisense
primer

<400> 2

ggctcttggc aaagttcc

18

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:sense primer

<400> 3

cgaaggcgcc ttctccgaaa

20

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:antisense

primer

<400> 4

aaatggcatc actcgtcttt tgctc

25

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:sense primer

<400> 5

cacgcccagag tacagtttgg

20

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:antisense
primer

<400> 6

gacttgtctc tcactcagat tgagg

25

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:sense primer

<400> 7

ggcagcaagc acaaagagga

20

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:antisense
primer

<400> 8

aggctgggta gggttttagga c

21

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence.

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:sense primer

<400> 9

cttgacccaa acaacccc

18

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:antisense
primer

<400> 10

ctctctgtta gggtgagaat cc

22

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:sense primer

<400> 11

gccaggagta cttccacc

18

<210> 12

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:antisense
primer

<400> 12

gtttccccgt ccttcacc

18

<210> 13

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:sense primer

<400> 13

gagcattgca cggactttct gaacc

25

<210> 14

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:antisense
primer

<400> 14

ccaggatgga gaagacaaca aaccc

25

<210> 15

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:sense primer

<400> 15

tgaacgggaa gctcactgg

19

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:antisense
primer

<400> 16

tccaccaccc tgttgctgta

20

<210> 17

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:sense primer

<400> 17

gtcgacaacg gctccggcat gtgc

24

<210> 18

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:antisense
primer

<400> 18

ggatcttcat gagtagtca gtcag

25

<210> 19

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:sense primer

<400> 19

ggttttgggt tagttttaat tttt

24

<210> 20

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:antisense
primer

<400> 20

ttctctaaat cctaaccctc taa

23

<210> 21

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:sense primer

<400> 21

ggtggaggtt tggagttt

18

<210> 22

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:antisense
primer

<400> 22

acaaaaacaa atataaaaac aaca

24

【図面の簡単な説明】

【図1】

A ; RLGSプロファイルによるスポットを観察した結果を示す図である。

B ; RLGS解析の結果、信号強度の減少あるいは欠失したスポットを示す図である。

【図2】

RLGSクローンをBLASTサーチ検索にかけた結果を示す図である。

【図3】

正常組織、グリオーマ組織及びグリオーマ細胞株におけるRFX1遺伝子の発現の有無をRT-PCR法によって解析した図である。

【図4】

正常組織、グリオーマ組織及びグリオーマ細胞株におけるBGT-1遺伝子の発現の有無をRT-PCR法によって解析した図である。

【図5】

正常組織、グリオーマ組織及びグリオーマ細胞株におけるHOXD9遺伝子の発現の有無をRT-PCR法によって解析した図である。

【図6】

薬剤処理を行ったヒトグリオーマ細胞株(U251)におけるRFX1遺伝子の発現状態の変化をRT-PCR法により解析した図である。

【図7】

4種類のグリオーマ細胞株におけるBGT-1遺伝子の5-アザシチジン及びトリコスタチンA処理による発現状態の相違をRT-PCR法によって解析した図である。

【図8】

正常脳組織及び種々のグリオーマ細胞株におけるHOXD8遺伝子の発現状態をRT-PCR法によって解析した図である。

【図9】

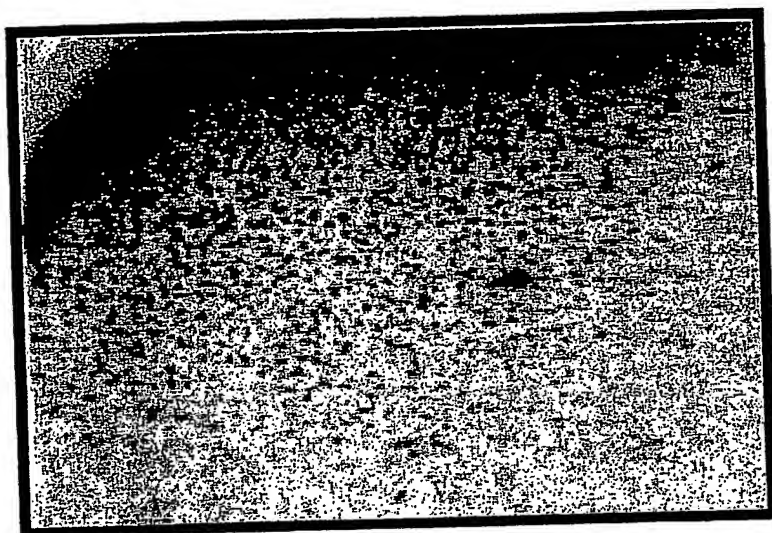
正常脳組織及び種々のグリオーマ細胞株におけるHOXA9、HOXB9、HOXC9遺伝子の発現状態をRT-PCR法によって解析した図である。

【書類名】

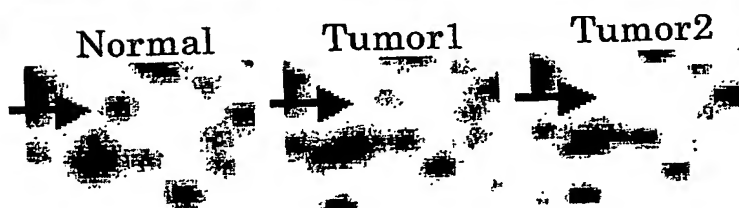
図面

【図1】

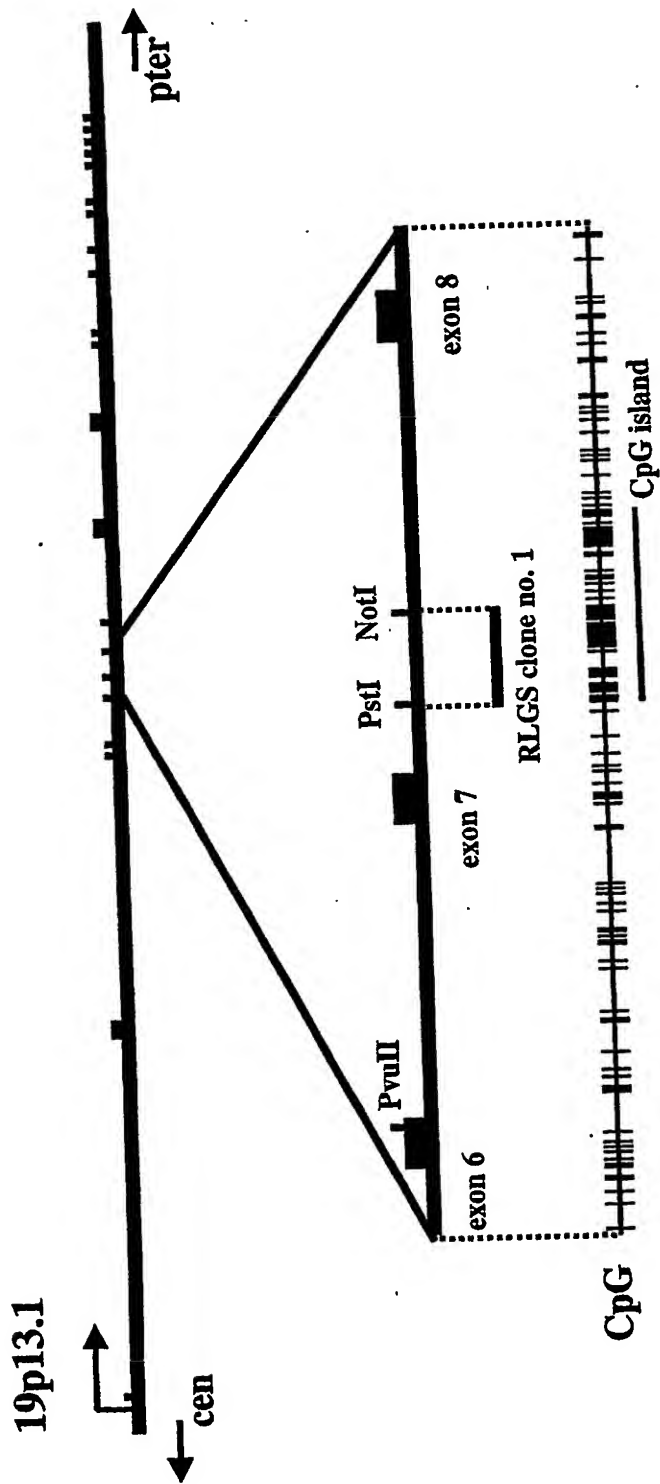
A



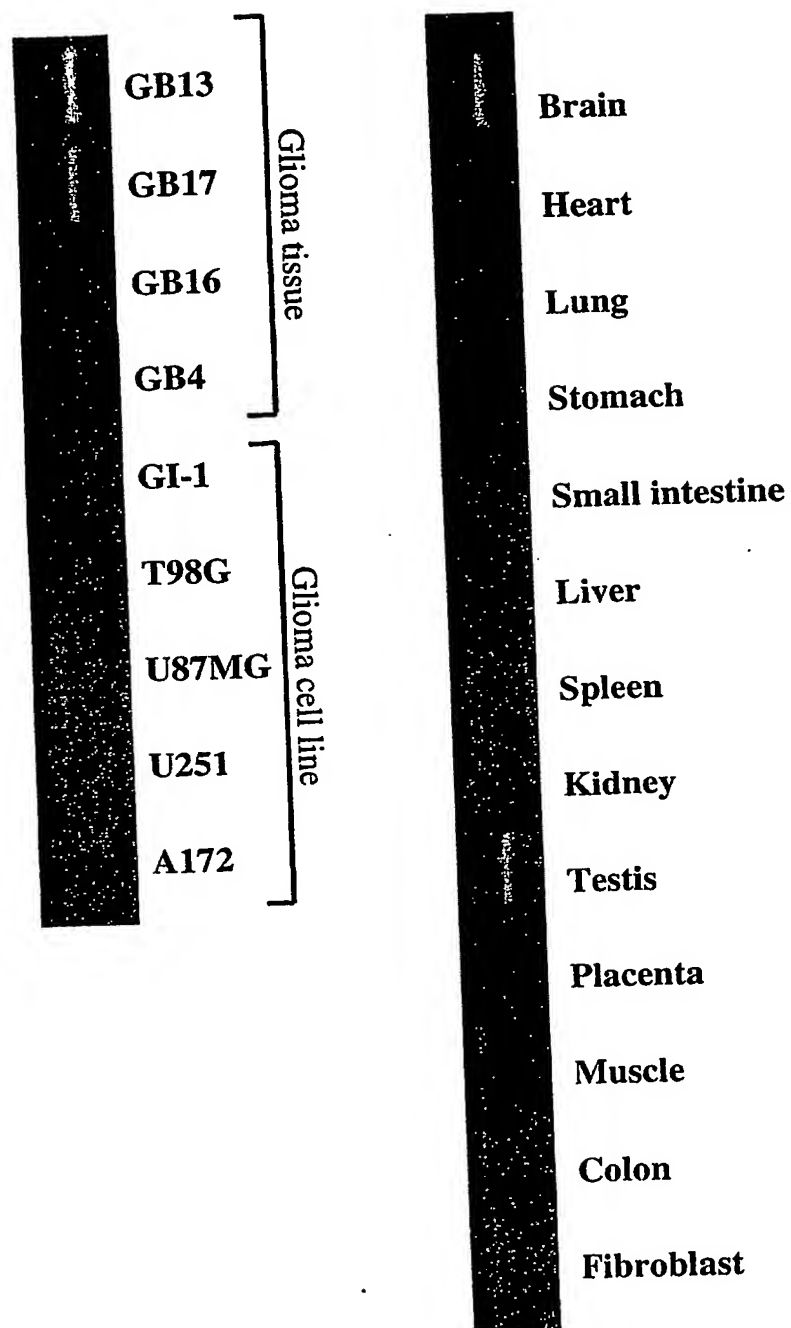
B



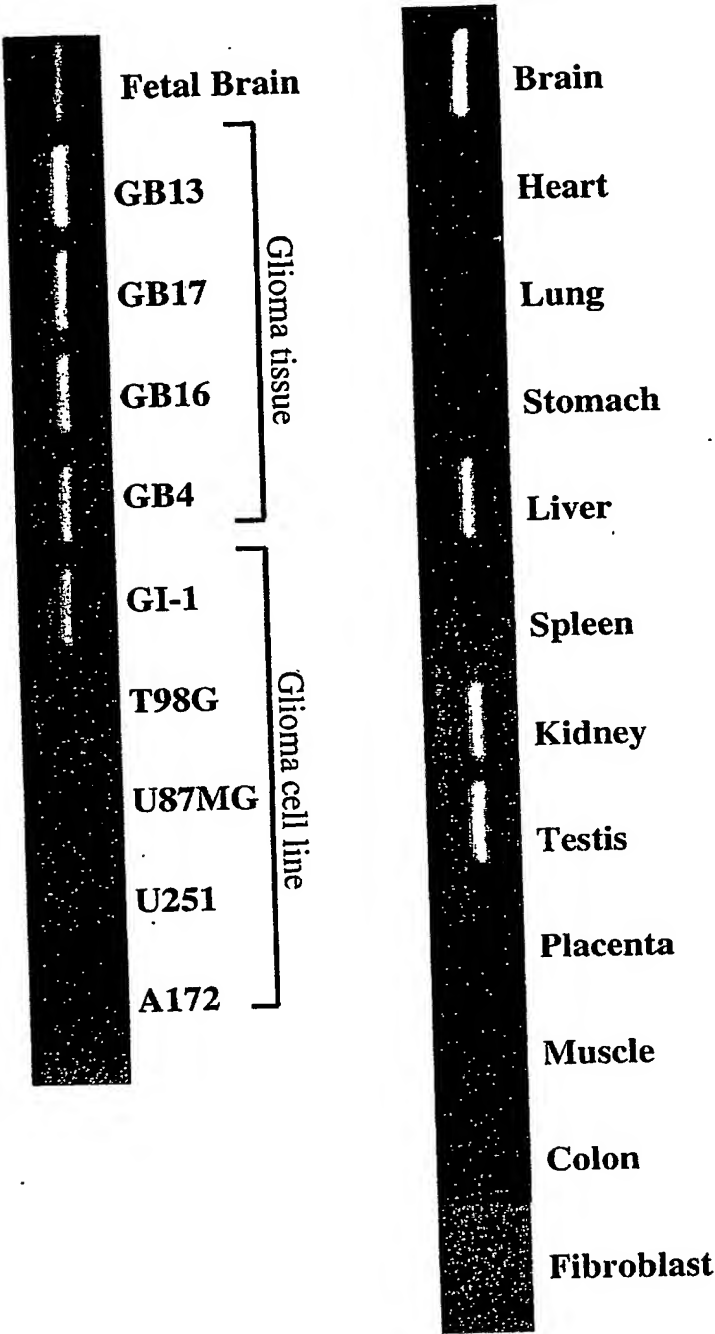
【図 2】



【図 3】



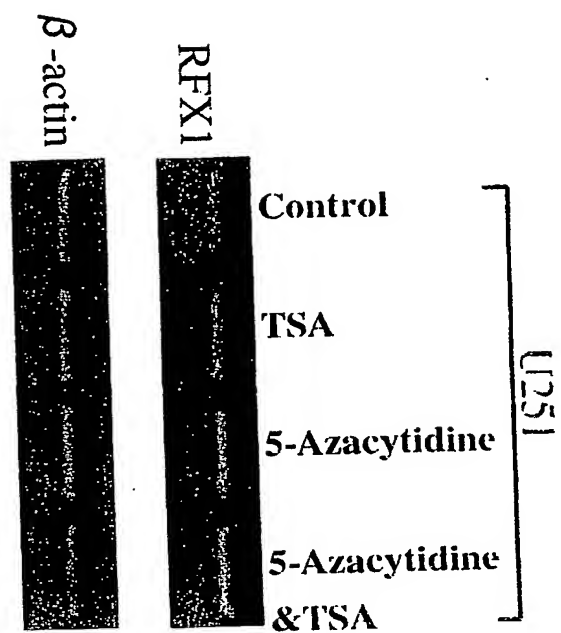
【図 4】



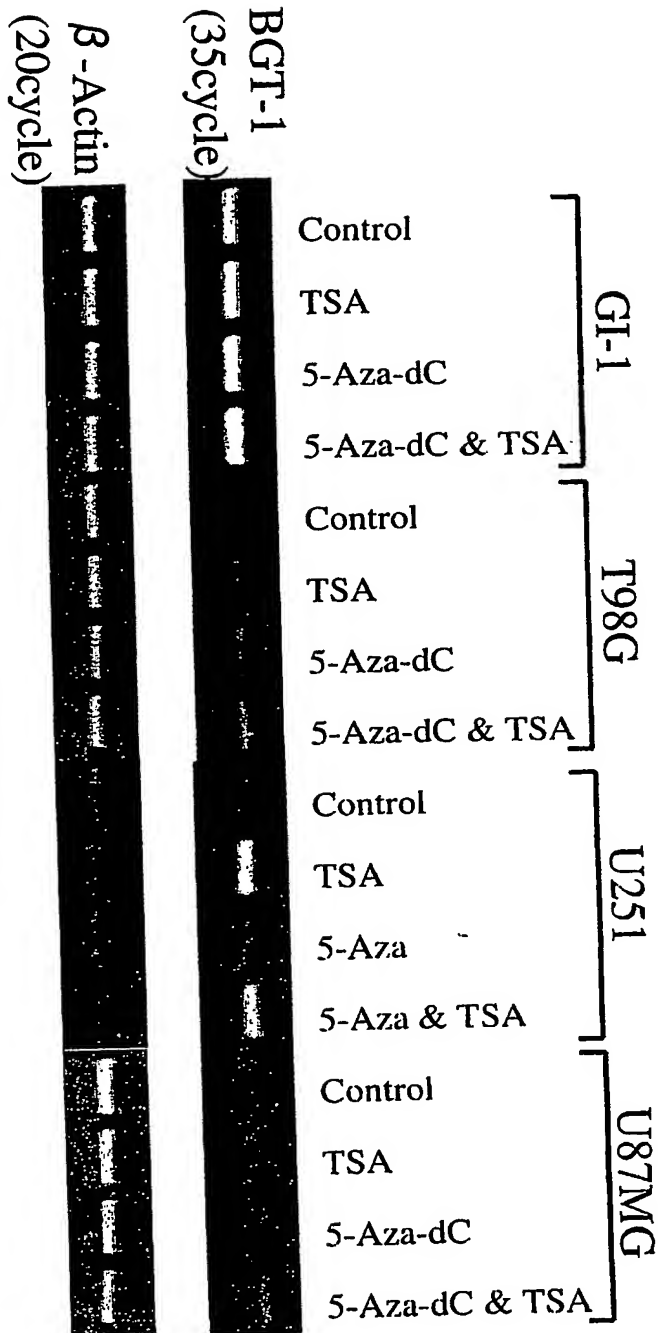
【図 5】

GB13	Glioma tissue	Brain
		Heart
		Lung
		Stomach
GB17	Glioma cell line	Small intestine
GB16		Liver
GB4		Spleen
GI-1		Kidney
T98G		Testis
U87MG		Placenta
U251		Muscle
A172		Colon
		Fibroblast

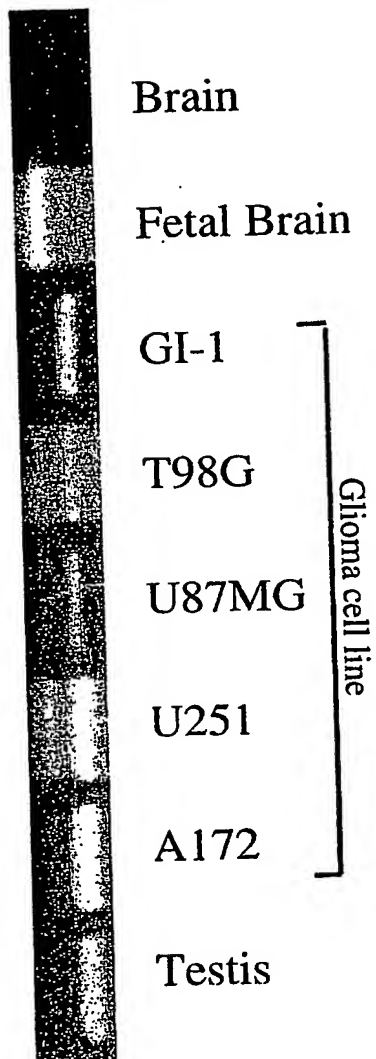
【図 6】



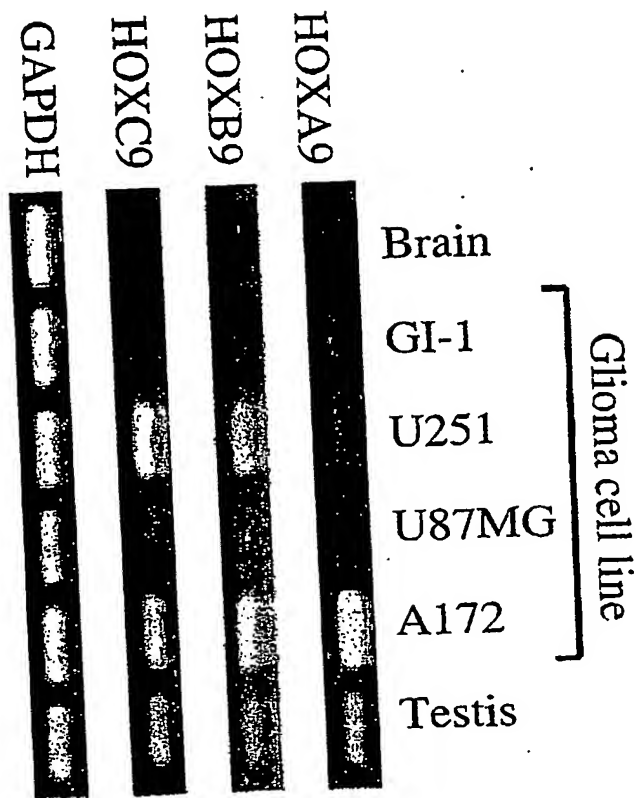
【図 7】



【図 8】



【図 9】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ヒトグリオーマ等の癌の診断や治療に有用な癌抑制遺伝子あるいは癌遺伝子を同定し、ヒトグリオーマ等の癌の診断方法や診断薬、ヒトグリオーマ等の癌の治療方法や治療薬を提供すること。

【解決手段】 ヒトグリオーマ又はヒトグリオーマ細胞株由来のジェノミックDNAと、正常組織由来のジェノミックDNAとにおけるCpGアイランドのシトシン残基のメチル化の程度を比較し、RFX1遺伝子、BGT-1遺伝子等の癌抑制遺伝子や、HOXD9遺伝子等の癌遺伝子をスクリーニングする。これら癌抑制遺伝子又は癌遺伝子を標的とすることで、ヒトグリオーマ等の癌の診断又は治療を実施する。

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-057926
受付番号	50200298992
書類名	特許願
担当官	伊藤 雅美 2132
作成日	平成14年 3月14日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

899000079

【住所又は居所】

東京都港区三田2丁目15番45号

【氏名又は名称】

学校法人 慶應義塾

【代理人】

申請人

【識別番号】

100107984

【住所又は居所】

東京都港区赤坂二丁目8番5号 若林ビル3階

廣田特許事務所

【氏名又は名称】

廣田 雅紀

【選任した代理人】

【識別番号】

100102255

【住所又は居所】

東京都港区赤坂二丁目8番5号 若林ビル3階

廣田特許事務所

【氏名又は名称】

小澤 誠次

【選任した代理人】

【識別番号】

100118957

【住所又は居所】

東京都港区赤坂二丁目8番5号 若林ビル3階

廣田特許事務所

【氏名又は名称】

岡 晴子

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[899000079]

1. 変更年月日

1999年 9月17日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都港区三田2丁目15番45号

氏 名

学校法人慶應義塾